

**AFPP – CINQUIÈME CONFÉRENCE INTERNATIONALE
SUR LES MÉTHODES ALTERNATIVES DE PROTECTION DES PLANTES
LILLE – 11 AU 13 MARS 2015**

**PROTECTION CONTRE L'ESCA, UNE MALADIE DU BOIS DE LA VIGNE, PAR UTILISATION DE
L'OOMYCETE *PYTHIUM OLIGANDRUM***

A. YACOUB^(1,2,3), J. GERBORE⁽⁴⁾, N. MAGNIN^(1,2), M.-C. DUFOUR^(1,2), M.-F. CORIO-COSTET^(1,2),
R. GUYONEAUD⁽³⁾ et P. REY^(2,1)

¹ INRA, ISVV, UMR1065 Santé et Agroécologie du Vignoble (SAVE), F-33140 Villenave d'Ornon, France,
E-mail : amira.yacoub@bordeaux.inra.fr

² Université de Bordeaux, ISVV, UMR1065 SAVE, Bordeaux Sciences Agro, F-33140 Villenave d'Ornon, France.

³ UMR CNRS 5254/IPREM-EEM, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64013 Pau, France.

⁴ BIOVITIS, 15400 Saint Etienne de Chomeil, France.

RESUME

Il est actuellement estimé qu'environ 13% du vignoble français est improductif suite aux pathologies affectant le bois des ceps, la principale d'entre elles étant l'esca. Un essai de protection biologique contre un champignon pathogène impliqué dans l'esca, *Phaeomoniella chlamydospora*, a été réalisé en utilisant l'agent de lutte biologique, *Pythium oligandrum*. Une réduction de 50% des nécroses au niveau de la tige dues à *P. chlamydospora* a été obtenue après application de l'oomycète sur les racines des ceps.

Une série de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défenses de la vigne a été utilisée afin de déterminer les réponses de la plante lors de l'interaction *P. oligandrum* / *Vitis vinifera* / *P. chlamydospora*. En présence de *P. oligandrum*, les plantes infectées par *P. chlamydospora* montrent une surexpression de certains gènes impliqués dans la biosynthèse des phytoalexines, i.e. la voie des phénylpropanoïdes et celle des indoles. Un effet potentialisateur des systèmes de défense induits par *P. oligandrum* a été observé.

Mots-clés : biocontrôle, Induction de résistance, *Pythium oligandrum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, RT-qPCR.

ABSTRAT

The oomycete, *Pythium oligandrum*, has been reported to control several diseases and is able to induce plant defense responses. In order to control grapevine trunk diseases, this oomycete was used to control a fungus involved in esca disease named *Phaeomoniella chlamydospora*. A greenhouse assay pointed out that necrosis on Cabernet Sauvignon cuttings caused by *P. chlamydospora* were half-reduced when *P. oligandrum* colonized the root system of young vines.

A serie of 22 genes involved in defense mechanisms of the grapevine was then used to determine plant responses in the interaction: *P. oligandrum* / *Vitis vinifera* / *P. chlamydospora*. When *P. oligandrum* colonizes the grapevines roots, plant response to infection with *P. chlamydospora* showed a quicker defense response and a more intense up-regulation of genes involved in the biosynthetic pathway of phenylpropanoids, indoles, a detoxifying enzyme and the cell wall synthesis. Priming is certainly induced by *P. oligandrum*.

Keywords: biocontrol, induction of resistance *Pythium oligandrum*, *Phaeomoniella chlamydospora*, and RT-qPCR.

INTRODUCTION

Les maladies du bois de la vigne sont devenues en l'espace d'environ vingt ans l'objet de préoccupations très importantes pour la filière viti-vinicole en France et dans le monde (Mugnai *et al*, 1999 ; Rumbos et Rumbou, 2001 ; Gimenez-Jaime *et al*, 2006 ; Bertsch *et al*, 2013).

L'esca, une des principales maladies du bois de la vigne, est une maladie de dépérissement à l'étiologie complexe, plusieurs facteurs biotiques (micro-organismes pathogènes), abiotiques, écophysiologiques, associés aux pratiques culturales expliqueraient les dépérissements des plantes. Les symptômes foliaires de l'esca résultent de la dégradation interne des tissus ligneux par des champignons lignicoles (Bertsch *et al*, 2013; Gimenez-Jaime *et al*, 2006; Larignon *et al*, 2009 ; Maher *et al*, 2012 ; Rumbos et Rumbou, 2001). Les agents fongiques impliqués sont: *Phaeomoniella chlamydospora*, *Phaeoacremonium aleophilum* et *Fomitiporia mediterranea*. Ils déstructurent de façon complémentaire le bois pour aboutir au faciès « amadou » et à l'expression de la maladie sous deux formes, celle dite lente avec des symptômes foliaires « bandes tigrées » et la forme apoplectique où le cep dépérit de façon foudroyante (Mugnai *et al*, 1999). Il faut toutefois mentionner que le rôle de ces micro-organismes n'est pas complètement élucidé. Suite à l'inoculation des ceps par ces champignons, les nécroses dans le bois sont reproduites, mais l'expression des symptômes foliaires est relativement difficile. On observe aussi que les champignons impliqués dans l'esca peuvent être présents dans le bois sain sans pour autant provoquer de symptômes. La détermination de la microflore responsable de l'esca demande donc encore à être précisée.

Pour lutter contre ces maladies, les viticulteurs sont devant une impasse phytosanitaire puisque le seul produit autorisé, l'arsénite de soude, a été interdit en 2001 à cause de sa toxicité pour l'environnement. Etant donné l'absence de traitements chimiques contre les maladies du bois de la vigne, le recours aux méthodes de lutte alternatives devient indispensable. Une de ces méthodes est la lutte biologique, utilisant les micro-organismes naturellement présents dans l'environnement pour lutter contre les agents pathogènes.

Dans ce contexte, un programme de recherche a été développé, dont l'objectif était de mettre au point une stratégie de lutte biologique contre l'esca par l'utilisation de l'oomycète *Pythium oligandrum*. Le choix s'est porté sur *P. oligandrum* car il s'agit d'un oomycète naturellement présent dans la rhizosphère des ceps de vigne de la région bordelaise (Gerborne *et al*, 2014). Dans la littérature, il est décrit pour ses propriétés d'agents de lutte biologique. Il peut exercer un effet, soit direct sur les champignons pathogènes, soit indirect en stimulant les systèmes de défense de la plante, ce qui leur permet de résister aux infections contre de nombreux agents pathogènes. Plusieurs travaux ont montré que cette induction pouvait être recréée en appliquant des protéines élicitrices produites par *P. oligandrum* (l'oligandrine, POD 1 et POD2) sur le végétal (Mohamed *et al*, 2006 ; Takenaka *et al*, 2006 ; Takenaka et Tamagake, 2009). Ce programme de recherche a tout d'abord consisté à isoler et purifier des souches de *P. oligandrum* à partir de racines de vignes prélevées dans le vignoble Bordelais et à les caractériser au niveau génétique (Gerborne *et al*, 2014). Toutes les souches isolées de *P. oligandrum* produisent de l'oligandrine mais les quantités produites sont différentes.

L'objectif de la présente étude est d'analyser les réponses de la plante lorsqu'elle développe une résistance contre *P. chlamydospora* suite à la colonisation des racines par *P. oligandrum*. Le choix a porté sur *P. chlamydospora* car ce champignon nécrogène est considéré comme l'un des pionniers du syndrome de l'esca. L'inoculation de ce champignon dans le bois a permis de reproduire aisément des lésions nécrotiques. Ces réponses de la vigne ont été étudiées au niveau moléculaire par analyse RT-qPCR de l'expression de 22 gènes impliqués dans les mécanismes de défense de cette plante (Dufour *et al*, 2013).

MATERIELS ET METHODES

Dispositif expérimental

Des boutures de Cabernet Sauvignon à « deux-yeux » (greffon certifiés de la Chambre d'Agriculture de Gironde, *Vitis vinifera* clone 169) âgées de 8 semaines ont été utilisées sous serre en conditions contrôlées. La température a été maintenue à 25°C (+/- 3°C) et les plants ont été arrosés quotidiennement pendant 2 minutes par un système de goutte à goutte (2 L/h) avec un apport d'engrais (20 N/20 P2O5/20 K2O) 2 fois par semaine. Les boutures ont reçu en moyenne 16 h de lumière par jour. L'essai a été conduit en randomisation totale avec 3 répétitions de 30 boutures par modalité. Les 5 modalités correspondent à des

plants (i) témoins, (ii) percés au niveau de la tige (témoin pour mimer le processus d'inoculation par *P. chlamydospora*), (iii) infectés par le champignon pathogène *P. chlamydospora* au niveau de la tige, (iv) avec racines traitées par un mélange de souches de *P. oligandrum*, (v) avec racines traitées par *P. oligandrum* et inoculées par *P. chlamydospora* au niveau de la tige.

Traitement par *P. oligandrum*

Les boutures ont été traitées au stade 7-8 feuilles avec 50 ml d'une solution de *P. oligandrum* au niveau des racines une première fois, versé à la surface du sol, puis une seconde fois trois jours plus tard avec 40mL. La suspension (mélange d'oospores et de mycélium) a été préparée par BIOVITIS S.A (Saint Etienne de Chomeil) à partir des souches CBS 118746 et cou59 avec une concentration pour chaque souche de 2×10^4 oospores par ml.

Inoculation par l'agent pathogène *P. chlamydospora*

Après 7 semaines de croissance sur malt agar à 25°C, l'agent pathogène *P. chlamydospora*, souche SO37, a été inséré sous forme de disque de mycélium dans la bouture préalablement percée à 4 mm de profondeur sous le premier bourgeon. Afin d'empêcher la pénétration d'autres champignons, le trou a été refermé avec de la paraffine. L'infection des plants par *P. chlamydospora* a été réalisée une semaine après la première inoculation par l'agent de biocontrôle *P. oligandrum*.

Prélèvement des échantillons

Les prélèvements de tige ont été réalisés à trois dates différentes au cours de l'essai sur une période d'environ 4 mois : T0 (soit le jour de l'inoculation avec *P. chlamydospora*, 2H après l'inoculation, T+7 et T+14 jours. Les prélèvements ont été effectués sur neuf boutures par modalité (3 plants * 3 répétitions) à chaque date.

Etude de l'expression des gènes de défenses de la vigne par RT-qPCR

Le niveau d'expression de 22 gènes impliqués dans les défenses de la vigne (Dufour *et al*, 2013) a été quantifié par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) et exprimé de façon relative par rapport à EF1 γ et GAPDH (Reid *et al.*, 2006) qui ont été utilisés comme gènes normalisateurs. Les 22 gènes choisis codent pour plusieurs types de protéines : des PR protéines, des protéines de la synthèse de la paroi (Dufour, 2012), des protéines de la voie des phénylpropanoïdes. Des gènes impliqués dans la voie de synthèse des oxylipines et celle de l'éthylène ont également été étudiés (tableau 1). Un niveau d'expression relatif est fortement significatif lorsque il est supérieur à 2 ou inférieur à -2, seuil où le gène est 2 fois plus ou 2 fois moins exprimé par rapport au témoin choisi.

Pour réaliser l'analyse, les ARN ont été extraits à partir du bois en utilisant le kit Qiagen RNeasy Plant et ils ont été transformés en ADNc en utilisant la M-MLV reverse transcriptase (Promega, selon les instructions du fournisseur). Le thermocycleur CFX 96 (Bio Rad) avec SYBR®Green a été utilisé pour évaluer l'expression des gènes sélectionnés. Les RT-qPCR ont été réalisées selon la méthode décrite par Dufour *et al* (2013). L'expression relative des différents gènes a été calculée selon la méthode décrite par Vandesompele (2002).

Tableau 1 : Liste des gènes utilisés pour étudier les réactions de défense de la vigne
List of studied genes involved in vine defenses

Gènes	Abrév.	Gènes	Abrév.
Références		Phénylpropanoïdes	
Chaîne gamma du facteur d'élongation	EF1 γ	Phénylalanine ammonia lyase	PAL
Glycéraldéhydes-3-phosphate déshydrogénase	GADPH	Stilbène synthase	STS
Indoles		Chalcone isomérase	CHI
Antranilate synthase	ANTS	Chalcone synthase	CHS
Chorismate mutase	CHORM	Leucoanthocyanidine dioxégénase	LDOX
Chorismate synthase	CHORS	Anthocyanidine réductase	BAN
Paroi		PR-protéines	
Callose synthase	CALS	PR protéines de classe 1	PR1
Peroxydase	PER	PR protéines de classe 10	PR10
Coniferyl alcohol glucosyl transférase	CAGT	Chitinase de classe III	CHIT3
Autres		Chitinase de classe IV	CHIT4
9-Lipoxygénase	9-LOX	Protéine inhibant les polygalacturonases	PGIP
Glutathione S-transférase	GST	B-1,3 glucanase	GLU
Acide 1-aminocyclopropane, 1-carboxylique oxydase	ACC	Inhibiteur de sérine protéase	PIN

Analyses statistiques

Afin de tester si les différences observées entre les modalités sont statistiquement significatives, le test de Kurskall-Wallis (test non paramétrique pour données à effectif faible et qui ne suivent pas une loi normale) a été utilisé. L'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel Systat.

RESULTATS

Protection des plants de vigne contre une attaque de *P. chlamydospora*

La taille des nécroses générées par *P. chlamydospora* dans la tige des boutures de Cabernet Sauvignon a été mesurée afin d'évaluer la capacité de *P. oligandrum* à induire une protection de la vigne dans le bois. Chez les plants témoins non percés et ceux percés au niveau de la tige (pour mimer le processus d'inoculation par *P. chlamydospora*) aucune nécrose n'a été détectée. Le niveau de nécroses a été environ 2 fois inférieur chez les plants colonisés au niveau de la rhizosphère par *P. oligandrum* en comparaison à ceux inoculés avec le *P. chlamydospora* seul, cette différence étant statistiquement significative selon l'analyse de variance (ANOVA, $p=2,2*10^{-16}$).

Etude de l'expression des gènes de défenses de la vigne par RT-qPCR

Analyse de l'expression des gènes suite au « perçage » de la tige

Pour évaluer l'effet du perçage des tiges, le niveau d'expression relative des gènes étudiés a été calculé par rapport aux plants témoins non inoculés par un micro-organisme (*P. chlamydospora* et/ou *P. oligandrum*) et non percés.

La figure 1 montre que le perçage cause un stress mécanique chez la plante, il se traduit par une surexpression de 12 gènes de défense de la plante à T0. Noter qu'ils sont dans chacune des 5 familles de gènes étudiées. L'effet du stress diminue au cours du temps pour tous ces gènes, sauf pour CHIT3. A T0, la famille de gènes qui répond le plus est celles des PR-protéines (7 gènes suivis). Les gènes PR10, CHIT3, PGIP et GLU sont surexprimés, tandis que le CHIT4 et le PIN sont réprimés. Cette tendance à la surexpression est retrouvée significativement à 7 jours pour la GLU, la PGIP, CHIT3, CHIT4 et PIN. Les valeurs baissent fortement à 14 jours, puisqu'à l'exception de la CHIT3 qui est surexprimée, 5 gènes sur 7 codant pour les PR-protéines sont réprimés.

Une expression différentielle au cours du temps est observée pour les 6 gènes codant pour les phénylpropanoïdes. La PAL et la STS ont une surexpression à T0. Ces valeurs baissent à T7 puis un faible état de répression est observé à T14. L'expression de la CHI est stable pour les 3 temps considérés. Les autres gènes ont, soit une faible répression (CHS, LDOX), soit une faible expression (BAN) à T0. Cette expression augmente à T7 puis à T14.

La LOX n'est pas activée à T0, elle l'est à un niveau très bas à T7 et T14. Le gène impliqué dans la voie de synthèse de l'éthylène (ACC) répond à T0 (+2.97), son expression se stabilise par la suite.

Analyse de l'expression des gènes après inoculation de la tige par *P. chlamydospora*

Les réponses de défense de la vigne suite à l'inoculation par l'agent pathogène *P. chlamydospora* ont été étudiées en prenant comme référence les plants percés, non traités par *P. oligandrum*, afin de soustraire « l'effet perçage » des résultats.

La figure 2 montre qu'à T0 et T7, les plants répondent faiblement à l'infection par *P. chlamydospora*, à l'exception de la CHIT4 qui est fortement surexprimée à T0 (+20.77). En effet, pour les gènes codant pour les PR-protéines, 2 heures après l'inoculation par *P. chlamydospora* (T0), seul le gène codant pour la CHIT4 est très fortement exprimé (+20.77). Quatre autres gènes (PR1, PR10, CHIT3 et PIN) le sont, mais dans une moindre mesure. Sept jours après infection par *P. chlamydospora*, à l'exception du gène CHIT3 dont l'expression est stable, les autres gènes sont faiblement réprimés (PR1, PGIP, GLU) ou montrent une faible expression (PR10, CHIT4). Quatorze jours après inoculation par *P. chlamydospora*, les 7 gènes codant pour les PR-protéines montrent une surexpression significative.

Concernant les 6 gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes, ils sont peu ou pas exprimés à T0, à l'exception de CHS. A T7, tous ces gènes sont réprimés et à T14, seule la STS (+3.93) est surexprimée et dans une moindre mesure la CHI et la LDOX.

Le gène impliqué dans la voie de synthèse des oxypilines (LOX) passe d'un état réprimé (-2.6), à 7 jours, à un état de surexpression à 14 jours (+5.64). La même tendance s'observe pour l'enzyme de détoxification (GST) qui est fortement activée à T14. La voie de l'éthylène est inactive (ACC) sur les 3 temps de prélèvement.

Analyse de l'expression des gènes après traitement des racines par *P. oligandrum*

Suite à l'introduction de *P. oligandrum* au niveau du système racinaire de la plante 7 jours avant l'inoculation par *P. chlamydospora* (T0), le niveau d'expression relative a été calculé par rapport au témoin non inoculé et non percé. D'une façon générale, l'expression des 22 gènes étudiés est faible (figure 3).

Concernant les PR protéines, la tendance à la répression est présente pour les 3 temps de prélèvements. La répression est plus forte à T0 qu'à T7 (où seul la CHIT3 est significativement réprimée) et T14 (où la GLU, CHIT4 et la PIN sont réprimées significativement).

Les gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes et dans la formation de la paroi sont réprimés à T0 (de -1.15 à -2.96), ils se stabilisent à T7 puis ils sont de nouveau légèrement réprimés à T14, sauf pour la LDOX (+2.08).

Les gènes impliqués dans la voie de la synthèse des indoles ne sont pas ou peu stimulés pour les 3 temps de prélèvements, les niveaux d'expressions oscillent entre -1.65 et 1.63.

Le gène LOX est uniquement exprimé à T14, alors que celui de l'ACC est très faiblement exprimé quel que soit les temps considérés. La GST est significativement réprimée à T0 et T14.

Analyse de l'expression des gènes après inoculation des racines par *P. oligandrum* puis des tiges par *P. chlamydospora*

Afin de comprendre le rôle de *P. oligandrum* dans l'expression des gènes de défense de la plante lorsqu'elle est infectée par *P. chlamydospora*, les expressions relatives des gènes des plants de la modalité *P. oligandrum* + *P. chlamydospora* ont été calculées par rapport aux plants infectés seulement par *P. chlamydospora* (figure 4).

A T0, la LDOX et la LOX sont les 2 seuls gènes légèrement surexprimés, la plupart des autres gènes, 17 sur 20, sont faiblement réprimés à T0 puis fortement surexprimés à T7. Les 6 gènes codant pour la voie des phénylpropanoïdes, les 3 de la voie des indoles, la LOX, l'AAC et le GST ainsi que 2 gènes impliqués dans la formation de la paroi (CALS et surtout PER) sont très fortement surexprimés à T7. Lors de ce prélèvement (T7), cette surexpression est moins marquée chez les gènes codant pour les protéines PR, à l'exception de la GLU et de la PR1. On peut noter que ces gènes (protéines PR) sont généralement les moins stimulés pour les 3 dates de prélèvements. La PIN est même constamment réprimée.

Une forte stimulation des gènes étudiés 7 jours après l'inoculation par *P. chlamydospora*, à l'exception de la famille des PR protéines, a été observée (Pour la famille des PR protéines, seulement la PR1 et la GLU sont significativement surexprimés). La forte stimulation observée des gènes se poursuit à 14 jours (T14) pour les gènes impliqués dans le renforcement de la paroi (CALS, PER et CAGT), dans la voie des indoles (ANTS, CHORM et CHORS) et la voie de l'éthylène (ACC).

Figure 1 : Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants de vigne percés au niveau de la tige par rapport au témoin non percé et non inoculé pour les 3 temps de prélèvements (T0, T7 et T14)

Figure 1: Relative gene expression in drilled plants. The level of relative gene expressions was calculated in relation to negative control. Each column represents the time point after pathogen inoculation (0, 7 and 14 dpi).

		T0	T7	T14
PR Protéines	PR1	-1.01		
	PR10	2.13		-2.30
	CHIT3	10.10		
	CHIT4	-4.03	2.66	-1.85
	PGIP	3.55	2.39	
	GLU	7.88	3.95	-1.62
	PIN	-2.24	4.13	-2.78
Phénylpropanoi des	PAL	5.53	1.34	
	STS	16.96		-2.42
	CHI	1.27		
	CHS	-2.59		
	LDOX	-1.50		
	BAN	1.30		
Indoles	ANTS	4.00		
	CHORM	1.31		
	CHORS	3.39		
Paroi	CALS	4.37	1.58	
	PER	-2.85	1.86	-2.05
	CAGT	3.12		
	LOX	-1.49		
	GST	1.86		-3.51
	ACC	2.97		

Seules les valeurs significativement différentes du témoin ont été présentées dans ce tableau. Les différences significatives ont été détectées à $p=0,05$ par le test Kruskal-Wallis. Pour la modalité témoin percé, nous n'avons pas fait de statistiques car on ne dispose que d'une seule répétition.

Figure 3 : Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants de vignes traités avec *P. oligandrum*, par rapport aux plants non traités, sur les trois temps de prélèvement (T0, T7 et T14)

Figure 3: Relative gene expression in plants treated with *P. oligandrum*. The level of relative gene expressions was calculated compared to negative control. Each column represents the time point after treatment (0, 7 and 14 dpi)

		To	T7	T14
PR Protéines	PR1			
	PR10			
	CHIT3		-3.45	
	CHIT4	-5.76		
	PGIP	-2.29		
	GLU	-19.46		-2.82
	PIN	-6.19		-2.58
Phénylpropanoi des	PAL			-1.88
	STS	-2.74		-2.21
	CHI	-2.22		
	CHS	-2.41		-1.78
	LDOX	-2.82	-1.40	2.08
	BAN	-2.03		
Indoles	ANTS		1.63	
	CHORM		-1.37	-1.65
	CHORS		1.35	
Paroi	CALS	-1.15	-1.45	-1.89
	PER	-1.57	1.58	
	CAGT	-2.96	1.35	-3.28
	LOX		-1.27	
	GST	-3.50		-2.22
	ACC	1.73		

Seules les valeurs significativement différentes du témoin ont été présentées dans ce tableau. Les différences significatives ont été détectées à $p=0,05$ par le test Kruskal-Wallis

Echelle

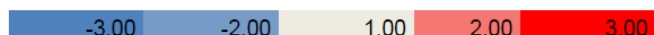


Figure 2 : Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants de vignes inoculés avec *P. chlamydospora* par rapport au témoin percé non inoculé par le pathogène, pour les 3 temps de prélèvement (T0, T7 et T14).

Figure 2: Relative gene expression in plants inoculated with *P. chlamydospora* compared to mock inoculated plants. Each column represents the time point after pathogen inoculation (0, 7 and 14 dpi).

		T0	T7	T14
PR Protéines	PR1			2.09
	PR10	2.15	1.18	4.13
	CHIT3	1.40	1.40	3.29
	CHIT4	20.77		7.25
	PGIP			1.69
	GLU	-1.37		1.79
	PIN			3.15
Phénylpropanoi des	PAL	-1.46	-2.32	
	STS			3.93
	CHI		-1.93	1.36
	CHS		-2.12	-1.29
	LDOX	-2.76	-2.00	1.54
	BAN	-2.01	-2.28	-1.43
Indoles	ANTS		-2.37	-1.61
	CHORM	2.20	-2.07	-1.77
	CHORS		-2.73	-1.97
Paroi	CALS			
	PER			1.59
	CAGT	1.96	-1.94	
	LOX		-2.61	5.64
	GST	1.55		3.23
	ACC			-1.80

Figure 4 : Niveau d'expression relatif des gènes chez les plants de vignes traités avec *P. oligandrum* et inoculés par *P. chlamydospora*, par rapport aux plants inoculés seulement par *P. chlamydospora*, sur les trois temps de prélèvement (T0, T7 et T14)

Figure 4: Relative gene expression in plants treated with *P. oligandrum* and inoculated with *P. chlamydopsora* compared to plants inoculated only with *P. chlamydospora*. Each column represents the time point after pathogen inoculation (0, 7 and 14 dpi)

		T0	T7	T14
PR Protéines	PR1	-2.07	5.23	
	PR10	-3.54		-1.98
	CHIT3	-1.86		
	CHIT4			1.13
	PGIP			
	GLU		3.68	
	PIN	-5.05		-1.73
Phénylpropanoi des	PAL		6.51	
	STS	-1.99	4.40	-1.45
	CHI	-2.23		
	CHS		15.74	1.81
	LDOX	2.07	7.04	
	BAN		3.99	-2.84
Indoles	ANTS	-2.39	3.23	1.37
	CHORM		5.33	1.75
	CHORS	-4.48	8.37	2.36
Paroi	CALS		1.84	4.98
	PER		11.90	2.50
	CAGT	-2.89		1.47
	LOX	2.38	8.46	
	GST	-1.96	3.22	
	ACC	-2.73	2.84	2.41

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'effet indirect de *P. oligandrum*, i.e. la résistance induite chez les plantes, a été utilisé lors de cette étude afin de lutter contre *P. chlamydospora*, un champignon impliqué dans l'esca, la principale maladie du bois de la vigne. Un essai en serre a montré que des boutures de Cabernet-Sauvignon, infectées au niveau de la tige par *P. chlamydospora* et préalablement colonisées au niveau du système racinaire par *P. oligandrum*, avaient développé des nécroses réduites d'environ 50% par rapport aux plants témoins. Afin de caractériser l'interaction tripartite plante/*P. oligandrum*/*P. chlamydospora*, le niveau d'expression de 22 gènes des systèmes de défenses de la vigne a été analysé au niveau moléculaire par RT-qPCR (Dufour *et al*, 2013). Les résultats de RT-qPCR ont montré des niveaux d'expressions différentielles selon que la plante était colonisée par l'agent antagoniste, *P. oligandrum*, le champignon pathogène, *P. chlamydospora*, ou les 2 micro-organismes. La réponse de la vigne à l'attaque par *P. chlamydospora* seul est caractérisée d'abord par une répression des gènes codant pour les PR- protéines, 7 jours après infection, puis par leur stimulation une semaine plus tard (+14 jours). Dans cette interaction les autres familles de gènes étudiées, e.g. phytoalexines et constituants de la paroi, sont réprimées à l'exception des stilbènes. Nos résultats diffèrent, pour partie, des travaux réalisés par Rotter *et al* (2009) lors de l'étude de l'interaction vigne / *Eutypa lata*. Ce dernier est un champignon nécrotrophe lignicole qui est responsable de l'eutypiose. Ils avaient constatés une surexpression de plusieurs protéines PR (CHIT, GLU, PR5, PR1) suite à l'infection de plants de vigne par *E. lata* mais aussi une surexpression de la PAL ainsi que d'autres protéines de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Il semblerait donc que la réponse de la vigne soit dépendante de l'espèce pathogène considérée, la plante adaptant son système de défense en fonction du pathogène.

Il est important de noter que la méthode d'inoculation de *P. chlamydospora*, i.e. le perçage de la tige, induit un stress abiotique non négligeable chez la plante comme l'indique la surexpression de nombreux gènes des 5 familles de gènes étudiés, 2 heures après le perçage. Noter que les 7 gènes codant pour les protéines PR étudiés dans le cas présent sont en moyenne les plus stimulés. Quelle que soit leur famille, cette surexpression de ces gènes s'atténue au fur et à mesure du temps, elle n'est plus observée 14 jours après le perçage de la tige. Globalement ces résultats montreraient que les PR protéines sont induites de façon peu spécifiques car elles réagissent aussi bien à un stress abiotique (perçage), que biotique, e.g. lors d'infection par *P. chlamydospora*, *E. lata*, *Botryosphaeriaceae* spp.

Le profil de réponses de la vigne à *P. oligandrum* seul, est très différent de celui observé lorsque l'agent pathogène est seul présent sur la plante ou lorsque les 2 micro-organismes colonisent le végétal. On ne constate en effet quasiment aucune induction de gènes.

Les plants pré-traités par *P. oligandrum*, répondent plus vite et plus fortement à l'attaque de *P. chlamydospora* en comparaison aux plants inoculés uniquement avec l'agent pathogène. Une plante pré-inoculée par l'agent de lutte biologique, montre une forte induction des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des phytoalexines, des enzymes de détoxification ainsi que des protéines de la paroi, 7 jours après infection par *P. chlamydospora*. Pour les PR protéines, seuls 3 gènes (PR1, GLU et PER) sont significativement surexprimés.

Ces résultats sont en accord avec les résultats de Mohamed *et al* (2006) qui ont montré que suite à un traitement au niveau des racines par *P. oligandrum*, les gènes codant pour les β -1,3-glucanase (GLU) et stilbène synthase (STS) sont surexprimés lors d'une attaque par *Botrytis cinerea*. Takenaka *et al* (2011) ont également montré qu'un traitement racinaire des plants de tomate par les protéines de la paroi cellulaire (CWP) de *P. oligandrum* entraîne une surexpression des gènes codant pour la PAL et certaines PR protéines, e.g. GLU. Dans la présente étude, au bout de 14 jours, seuls les plants colonisés par *P. oligandrum* et infectés par *P. chlamydospora* ont les gènes impliqués dans le renforcement de la paroi végétale et du tryptophane fortement exprimés. Ceci pourrait être une stratégie de la plante pour limiter le développement du pathogène. La surexpression des gènes codant pour des molécules renforçant la paroi (callose et lignine) permettrait de renforcer cette barrière et limiterait la pénétration par d'autres agents pathogènes. La voie du tryptophane étant

impliquée dans la synthèse de l'auxine, la surexpression de ANTS et CHORS permettrait de stimuler la croissance de la plante.

Généralement, l'application du *P. oligandrum* ou de ses protéines élicitrices active la voie de signalisation de l'acide jasmonique et celle de l'éthylène (Takahashi *et al*, 2006 et Kawamura *et al*, 2009), alors qu'il n'est pas connu pour activer la voie de l'acide salicylique (Takahashi *et al*, 2006). Dans notre étude, la voie de l'éthylène est activée dans les plants traités par *P. oligandrum* puis inoculés par *P. chlamydospora*. Concernant la voie de l'acide jasmonique et celle de l'acide salicylique, aucun gène étudié n'est directement impliqué dans ces 2 voies de signalisation. Un dosage de ces 2 acides au niveau des tissus des plants traités par *P. oligandrum* puis inoculés par *P. chlamydospora* pourrait nous donner une idée de l'activation ou non de ces voies.

La comparaison du profil de réponse de la vigne inoculée seulement par *P. oligandrum* par rapport à celui d'une plante inoculée par *P. oligandrum* puis infectée par *P. chlamydospora*, montre que les mécanismes de défense de la vigne ne sont induits qu'en cas d'infection par *P. chlamydospora*. L'hypothèse d'un effet potentialisateur ou « priming » est alors envisageable. La potentialisation est un état physiologique qui permet à la plante d'induire plus vite et plus intensément ses mécanismes de défense lorsqu'elle est soumise à un stress (Conrath, 2009). Cet effet « priming » a déjà été décrit chez la vigne par Theocharis *et al* (2010). Ces auteurs ont montré qu'un traitement avec la souche PsJN de *Burkholderia. phytofirmans* stimule les défenses des plants de vigne uniquement lors d'un stress biotique, dans ce cas le froid.

En conclusion, la présente étude a montré que *P. oligandrum* présente des potentialités intéressantes pour lutter contre un champignon impliqué dans l'esca, une maladie contre laquelle les viticulteurs n'ont aucun moyen de lutte efficace. Ainsi *P. oligandrum* stimule les réactions de défense des plants de vigne ce qui induit un niveau de protection de 50% par rapport aux plants témoins infectés. Cette étude encourage aussi à poursuivre les investigations en explorant l'effet des molécules élicitrices de *P. oligandrum*, par exemple en traitement des jeunes ceps avec le filtrat de culture du *P. oligandrum* ou les molécules élicitrices pures. L'utilisation d'autres gènes impliqués dans les voies de défenses de la plante, *e.g.* voie de l'acide salicylique, l'acide jasmonique, d'autres métabolites secondaires, ..., apporterait d'autres informations sur l'effet du *P. oligandrum* dans l'interaction avec la plante et l'agent pathogène *P. chlamydospora*

REMERCIEMENTS

Ces travaux ont été financés par le programme Casdar du Ministère français en charge de l'Agriculture et le CNIV (projet V 1302) et par le Ministère tunisien en charge de la recherche.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bertsch C., Ramirez-Suero M., Magnin-Robert M., Larignon P., Chong J. et Abou-Mansour E., 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. *Plant Pathology*, 62, 243-265.
- Conrath U., 2009. Priming of induced plant defense responses. *Advances in Botanical Research*, 51, 361-395.
- Dufour M. C., 2012. Etude de l'efficacité des défenses de différents génotypes de *Vitis* induites par élicitation face à la diversité génétique de bioagresseurs (*Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator*) : du gène au champ. *Thèse de doctorat*. Bordeaux, 384p.
- Dufour M.C., Lambert C., Bouscalt J., Mérillon J.M. et Corio-Costet M.F., 2013. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*, 62, 370-382.
- Gerbore J., Vallence J., Yacoub A., Delmotte F., Grizard D., Regnaut Roger C. et Rey P., 2014. Characterization of *Pythium oligandrum* populations that colonize the rhizosphere of vines from the Bordeaux region. *FEMS Microbiology Ecology*, 90, 1, 153-167.
- Gimenez-Jaime A., Aroca A., Raposo R., Garcia-Jimenez J. et Armengol J., 2006. Occurrence of fungal

pathogens associated with grapevine nurseries and the decline of young vines in Spain. *Journal of Phytopathology*, 154, 598-602.

Mugnai L., Graniti A. et Surico G., 1999. Esca (Black measles) and brown wood-streaking : Two old and elusive diseases of grapevines. *Plant Disease*, 83, 404-418.

Maher N., Piot J., Bastien S., Vallance J., Rey P. et Guerin-Dubrana L., 2012. Wood necrosis in esca-affected vines: types, relationships and possible links with foliar symptom expression. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 46, 15-27.

Kawamura Y., Takenaka S., Hase S., Kubota M., Ichinose Y., Kanayama Y., Nakaho K., Klessig D.F., Takahashi H., 2009. Enhanced Defense Responses in Arabidopsis Induced by the Cell Wall Protein Fractions from *Pythium oligandrum* Require SGT1, RAR1, NPR1 and JAR1. *Plant Cell Physiol.*, 50, 924-934.

Larignon P., Fontaine F., Farine A., Clément C. et Bertsch C., 2009. Esca et Black Dead Arm : deux acteurs majeurs des maladies du bois chez la Vigne. *R. Biologies*, 332.

Mohamed N., Lherminier J., Farmer M.J., Fromentin J., Beno N., Houot V., Milat M.L. et Blein J.P., 2007. Defense responses in grapevine leaves against *Botrytis cinerea* induced by application of a *Pythium oligandrum* strain or its elicitor, oligandrin, to roots. *Phytopathology*, 97, 5, 611-620.

Reid K.E., Olsson N., Schlosser J., Peng F. et Lund S.T., 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology*, 6, 27.

Rotter A., Camps C., Lohse M., Kappel C., Pilati S., Hren M., Stitt M., Coutos-Thévenot P., Moser C., Usadel B., Delrot S., Gruden K., 2009. Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine. *BMC Plant Biology*, 9, 104-118.

Rumbos I. et A. Rumbou, 2001. Fungi associated with esca and young grapevine decline in Greece. *Phytopathologia Mediterranea*, 40, S330-S335.

Takahashi H., Ishihara T., Hase S., Chiba A., Nakaho K., Arie T., Teraoka T., Iwata M., Tugane T., Shibata D., Takenaka S., 2006. Beta-cyanoalanine synthase as a molecular marker for induced resistance by fungal glycoprotein elicitor and commercial plant activators. *Phytopathology*, 96, 908-916.

Takenaka S. et Tamagake H., 2009. Foliar spray of a cell wall protein fraction from the biocontrol agent *Pythium oligandrum* induces defence-related genes and increases resistance against *Cercospora* leaf spot in sugar beet. *Journal Gen. Plant Pathol*, 75, 340-348.

Theocharis A., Bordiec S., Fernandez O., Paquis S., Dhondt-Cordelier S., Baillieul F., Clement C. et Barka E.A., 2010. Priming *Vitis vinifera* L. with plant growth promoting *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN enhances its acclimation to low non-freezing temperatures. *IOBC/WPRS Bulletin*, 78, 28-28.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. et Speleman F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3, 34-40.